

**Re: Application No. 10/588,323
 Magilavy et al.
 Information Disclosure Statement
 filed August 31, 2007**

**Cited References
 B21 - B30**

DNA sequences, recombinant DNA molecules and processes for producing lymphocyte function associated antigen-3

Publication number: JP2501113T

Publication date: 1990-04-19

Inventor:

Applicant:

Classification:





- international: G01N33/53; C07H21/04; C07K14/00; C07K14/435; C07K14/705; C12N1/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; G01N33/569; A61K38/00; C12R1/19; C12R1/91; G01N33/53; C07H21/00; C07K14/00; C07K14/435; C12N1/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; G01N33/569; A61K38/00; (IPC1-7): C07H21/04; C07K13/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12P21/02; G01N33/53

- european: C07K14/705B22; G01N33/569H2

Application number: JP19880505208 19880603

Priority number(s): US19870057615 19870603

Also published as:

 WO8809820 (A1)
 EP0315683 (A1)
 US4956281 (A1)
 HU211627 (A9)
 EP0315683 (A4)

more >>

Report a data error here

Abstract not available for JP2501113T

Abstract of corresponding document: US4956281

Polypeptides that bind to CD2, the receptor on the surface of T-lymphocytes. Most preferably, the polypeptides bind to CD2 on the surface of T-lymphocytes and inhibit adhesion between T-lymphocytes and target cells. DNA sequences that code on expression in appropriate unicellular hosts for those polypeptides. Methods of making and using those polypeptides in therapy and diagnosis.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

⑩日本国特許庁(JP)

⑪特許出願

⑫公表特許公報(A)

平2-5(

⑬公表 平成2年(1990)

⑭Int. Cl.⁹

識別記号

庁内整理番号

審査請求
予備審査請求

未請求
未請求

部門(区分)

C 12 N 15/12
C 07 H 21/04
C 07 K 13/00

ZNA

8318-4H*

(全

⑯発明の名称 DNA配列、組換えDNA分子及びリンパ球機能-会合した抗原-3の製造方法

⑰特 願 昭63-505208

⑱翻訳文提出日 平1(1989)2月2

⑲出 願 昭63(1988)6月3日

⑳国 際 出 願 PCT/US88/01824

㉑国際公開番号 WO88/09820

㉒国際公開日 昭63(1988)12月15

優先権主張 ㉓1987年6月3日㉔米国(US)㉕057,615

㉖発 明 者 ウォルナー、バーバラ ビー

アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジ
ター ストリート 7

㉗出 願 人 バイオジェン インコーポレイ
テッド

アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02142、ケンブリッジ
ブリッジ センター 14

㉘代 理 人 弁理士 浜田 治雄

㉙指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許),
特許), HU, IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲:

1. (a) フォーリス HT14中に担持されるDNA挿入断片;
(b) 前記DNA挿入断片に対して1ε以下の約20-17
に相当する条件下にハイブリッド形成し、かつCD2、T-リ
ンパ球の表面上のレセプターに結合するポリペプチドに対す
る発現上にコード付けするDNA配列; 及び
(c) 前記DNA配列又は挿入断片のどれかにより
発現に対して発現上にコード付けされたポリペプチドに対す
る発現上にコード付けするDNA配列
から成る群から選択されたDNA配列。
2. 前記DNA配列(b)がT-リンパ球の表面のCD2に結合
し、かつT-リンパ球と標的細胞との間の粘着を防止するポリペ
プチドに対する発現上にコード付けする請求項1記載のDNA配
列。
3. 前記ポリペプチドが可溶性である請求項1記載の
DNA配列。
4. 前記DNA配列が、第3図の式H₁, ..., のDNA配列、
第3図の式H₂, ..., のDNA配列、第4図の式H₁, ..., のDNA配列、
第3図の式H₁, ..., H₂, ..., のDNA配列、第3図の式
ATG-H₁, ..., のDNA配列、第3図の式ATG-H₁, ..., H₂, ...,

5. 前記DNA配列が、第3図の式H₁, ..., のDNA配列、
第3図の式ATG-H₁, ..., のDNA配列及び前記DNA配列の
対する発現上にコード付けするDNA配列から成る群か
ら選択される請求項1記載のDNA配列。

6. 請求項1-5のDNA配列から成る群から選択
されたDNA配列を含む組換えDNA分子であり、前記DNA配列はT
DNA分子中の発現制御配列に作用的に結合されてい
る分子。

7. 前記発現制御配列が、SV40又はアデノ
の初期又は後期プロモーター、lacシステム、lucシ
ステム、lacシステム、lacシステム、lacシステムの主要オペ
レーター領域、10塩基タンパク質の制御領域、
グリセリン酸キナーゼ又は他のグルコース分解酵素
プロモーター、酸ホスファターゼのプロモーター及
トC-交配因子のプロモーターから成る群から選択
された請求項1記載の組換えDNA分子。

8. 分子が、pLP131701、908、pLP131710、
及びpLP131725から成る群から選択される請求項1記
載のDNA分子。

9. 請求項6, 7又は8の組換えDNA分子から成る
又は組換えDNA分子により形質転換された中細胞。

12. 請求項1-5のDNA配列から成る群から選択されたDNA配列により発現上にコード付けされたポリペプチドであり、前記ポリペプチドはヒト細胞の他のタンパク質が本質的に無いポリペプチド。

13. 前記ポリペプチドが、第1図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第2図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第3図の式 $Vopt-AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第4図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第5図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第6図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、第7図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチド、及び第8図の式 $AA_1 \dots AA_{n-1} \dots AA_n$ のポリペプチドから成る群から選択される請求項12記載のポリペプチド。

14. 請求項9記載の単細胞培養を誘発する段階を含むポリペプチドの製造方法。

15. 形質転換した宿主が、CHO(BG8)、R1.1(BG6)、L-8(1Y)(BG8)、大腸菌JA221(pLP38:col)、CHO(PLPA8M16)、CHO(PLPA8M17)及びCHO(PLPA8M18)から成る群から選択される請求項14記載の方法。

16. 請求項12又は13のポリペプチドから成る群から選択されたポリペプチドの免疫抑制又は促進に有効量と薬学的に受け入れ可能な担体とを含む医薬品組成物。

17. 請求項18の組成物から成る群から選択された組成物により細胞学的に受け入れ可能な方法で患者を治療する段階を含む患者を治療する方法。

18. T-細胞サブセット、CD2+細胞を抽出し、請求項12又は13のポリペプチド又はこれらポリペプチドから成る群から選択されたポリペプチドの効果を含有過剰な又は過剰されたT-細胞により特定の疾患の過程をモニターする診断組成物。

19. T-細胞サブセット、CD2+細胞を抽出し、請求項13の組成物から成る群から選択された組成物として使用する段階を含む過剰な又は過剰されたT-細胞を特徴づけられる疾患の過程をモニターする方法。

20. T-細胞サブセット、CD2+細胞を抽出し、又は請求項18の組成物から成る群から選択された組成物を含む過剰な又は過剰されたT-細胞により特徴づけられる過程をモニターする方法。

要約

DNA配列、組換えDNA分子及びリンパ球機能-含有した抗原-3の製造方法

本発明は、DNA配列、組換えDNA及びリンパ球機能の含有した抗原-3(LPA-3)の製造方法に関するものである。更に特別には、本発明は、DNA配列が、CD2、即ちT-リンパ球の表面のレセプターに結合したLPA-3又はその誘導体に対して、適切な単細胞培養室中の発現にコード付けすることを特徴とするDNA配列に関するものである。更に好適には、本発明のLPA-3及びその誘導体はT-リンパ球の表面のCD2に結合する。最も好適には、これらはまた、T-リンパ球と抗原細胞との間の結合を防止する。本発明によると、これらのDNA配列で変換された単細胞培養室とこれらを含む組換えDNA分子は、ヒト起源の他のタンパク質が本質的に無いLPA-3を製造するのに使用されて良い。それ故にこの新規な抗原は、治療と診断の相成物において及びこの発明の方法において使用されて良い。

本発明の背景

T-リンパ球は、抗原細胞及び抗原提示細胞と相互作用

T-リンパ球の抗原及び抗原-提示細胞との相互作用は、高度に特異的であって、かつ抗原又は抗原細胞上の抗原は、T-リンパ球の表面上の多くの特異的レセプターによる認識に左右される。

T-リンパ球と他の細胞のレセプター-抗原相互作用はまた、各種のT-リンパ球表面タンパク、例えば、チヌー複合体のCD3(72)と補助分子のCD4、LFA-1、CD8により促進される。それはまた、抗原又は抗原-提示細胞に発現されるLFA-3、ICAM-1及びVHCのような抗原に左右される。事実、T-リンパ球上の及び抗原又は抗原細胞上の補助分子は、相互作用して細胞間の結合を促進されている。従って、これらの補助分子は、抗原-抗原-提示細胞とリンパ球-抗原細胞との相互作用、かつ白血球-内皮細胞相互作用とリンパ球-抗原細胞間と関係している。

例えば、最近の研究は、CD2(T-リンパ球補助分子)とT-リンパ球の抗原細胞への結合を促進するLFA-3(LFA-3補助分子)の間の特異的相互作用があることを提案し、この結合は、T-リンパ球の機能化等の開始に本質的である。LFA-3補助分子、CD2に結合した複製したリンパ球-含有した抗原-3及びT-リンパ球抗原の相互作用

T-リンパ球-仲介された細胞溶解と抗原会合した3つの異なる抗原: LFA-1, LFA-2, 及び LFA-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (「プロセーディング ナショナル アカデミー サイエンス、米国」), 第79巻, 第7(89-92頁 (1982))。

LFA-3は、抗原-提示細胞、及び樹状細胞、特に単核、顆粒球、CTL細胞、B-リンパ球、脾臓細胞、血管内皮細胞、及び繊維芽細胞に見いだされる(スプリンゲル等、上記文献)。

ヒトLFA-3は、ヒト赤血球から精製されている(ダステン等、上記文献)。これは、低含有量約50%の分子量60,000-70,000の糖タンパク質である。この糖質LFA-3は、T-リンパ球の表面のCD2へ結合しており、かつT-リンパ球と赤血球の粘着を防止する(ダステン等、上記文献)。

しかし、治療と診断における基本的使用に対して、必要のより安価なLFA-3が、赤血球からの精製で入手されるものよりも希望されている。更に、治療の使用に対して、B型肝炎ウイルス又はエイズウイルスのようなウイルスで汚染されているかもしれないヒト赤血球と異なる他の原料からのLFA-3を得ることがより好ましいであろう。

発明の概要

本発明は、これらの問題を解決する。本発明は、CD2、即ちT-リンパ球の表面のレセプターに結合するLFA-3とその誘導体を多量に提供する。更に好適には、本発明のLFA-3及びその誘導体は、T-リンパ球の表面のCD2へ結合しており、かつこれらはまた、T-リンパ球と標的細胞の間の粘着を防止する。更に特効には、本発明は、可溶性形態のLFA-3に關

するものである。本発明はまた、ヒト起源の他のクの本質的に無かつエイズ又はB型肝炎のようなウイルスより汚染されていない形態のLFA-3を提供する。

本発明は、これらの目的を、適切な単細胞発現にLFA-3又はこれらの誘導体に対してコード付の配列を提供することにより達成するものである。更明は、可溶性形態のLFA-3に対する発現にコード付の配列とを特徴とするDNA配列を提供するものである。

本発明はまた、これらのDNA配列とこれらで得られた単細胞宿主を含む組換えDNA分子を誘導するもの。これらの宿主は、広範囲の各種治療及び診断の場面に使用するための本発明の新規なLFA-3と誘導体を製造することを可能とする。

本発明のDNA配列は:

- (a) DNA配列: フォージ入ATGCに結合される断片;
- (b) 前記DNA配列に対して7a以下の約20-271の条件下にハイブリッド形成され、かつT-リンパ球の表面のレセプターへ結合するリペプチドに対して発現にコード付けられた配列; 及び
- (c) 前記DNA配列のいずれかにより発現に対してコード付けされたポリペプチドに対してコード付けするDNA配列

から成る群から選択される。

図面の簡単な説明

第1図は、H-末端のアミノ酸配列と、免疫親和性クロマトグラフィーを使用してヒト赤血球から精製したヒトLFA-3の各種ペプチド断片を示している。

第2図は、ヒト赤血球から精製したヒトLFA-3のアミノ酸配列から誘導した化学的に合成したオリゴヌクレオチドDNAの2つのプールを示している。

第3図は、フォージ入ATGCに結合されるDNA挿入断片のDNA配列を示している。第4図はまた、ヒトLFA-3とこれから決定されるアミノ酸配列に対して発現にコード付けするCD2のヌクレオチド配列を示している。

第5図は、配列決定のプラスミドpEV01C関係部分を示している。

第6図は、プローブLFA-10, LFA-11, HA-A, HA-B, HA-C, 及びHA-Dを示している。

発明の詳細な説明

発明者等は、2つのライブラリーから本発明のDNA配列を単離した: 白血球膜から末梢血液リンパ球から誘導したλgt10 cDNAライブラリーとヒト扁桃から誘導したλgt10 cDNAライブラリーである。しかし、発明者等は、

これらのライブラリーをスクリーニングする発明者等は、一連の化学的に合成した非転写オリゴヌクレオチドプローブを使用した。発明者等は、発明者: 赤血球から精製したLFA-3を使用して決定したLFA-3断片のアミノ酸配列を考慮してこれらのプローブを選択した。これらの断片は、第1図に示している。発明者等は、これらのオリゴヌクレオチドプローブの誘導を可能にする各種領域からアミノ酸を選択した。

発明者等は、プローブの2つのプール: 32-ホールド縮重10-マーであり、かつLFA-3は、38-ホールド縮重20-マーである。この後者のプールの高さに、発明者等は、プールを各々が38-ホールド縮重のプールに分割した。LFA-3, LFA-2, LFA-1及びLFA-4に細断した。

スクリーニングのために、発明者等は、ハイブリッド形成スクリーニング検査を利用する発明者: cDNAライブラリーに対して、発明者等のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリッド形成した。発明者等は、発明者等のプローブに対してハイブリッド形成するクを選択した。更に、選択したクローンのcDNA挿入断片かつプラスミド中にサブクローン化した後に、発明者

決定した。

発明者等は、これらのcDNAの最長のヌクレオチド配列(フージムHT16のcDNA挿入断片)とLFA-3とそれから推定されるアミノ酸配列に対してコード付けするDNA配列を第3図に表現している。第3図に示すように、このcDNA挿入断片は、756bpの塩基対(250アミノ酸)、16bpの翻訳しない領域及び201bpの翻訳しない領域を有する。発明者等がヒト赤血球から精製したLFA-3から決定したN-末端アミノ酸配列を有する第3図の推定アミノ酸配列の比較は、アミノ酸-21-1は、信号配列から成り、かつアミノ酸1-222は成熟LFA-3のタンパク質配列から成ることを暗示している。

第3図に示されかつ預けたクローニングHT16に含まれるcDNA配列は、本発明に従って各種方法で使用される。これは、その一部、又はこれらの合成又は半合成コピーは、DNAプローブとして使用して、他のヒトのcDNA又は動物のcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングして良く、このゲノムライブラリーは、LFA-3に関する他のDNA配列を、ハイブリッド形成により選択するためのものである。代表的に、普通のハイブリッド形成条件、例えば、 T_m 以下約20-25°Cが、このような選択に適用される。しかし、より少ない厳密条件は、ライブラリーがライブラリーと異なる種からのプローブでスクリーニングされる場合に、例えば、ヒトプローブでマウスライブラリーのスクリーニングする場合必要である。

第3図のcDNA、その一部、又はこれらの合成又は半合成コピーはまた、各種変異を誘発する出発材料として使用される。このような変異は、どちらかの簡便であって良く、即ち、変異は、変異コドン又は挿入変異によりこれに対して暗

号化されるアミノ酸配列を変えず、即ち、変異は、コドンによりこれに対して暗号化されるアミノ酸配列。例えば、これらの変異は、より容易な複製又はLFA-3活性のような、より高いレベルの製造を可能。

これらの点での理由に対して、本発明のDNA

(a) DNA配列：フージムHT16に担持される断片；

(b) 前記DNA配列に対して T_m 以下の約10-25°Cの条件下にハイブリッド形成され、かつT-リンパ球の表面のレセプターへ結合するペプチドに対して発現にコード付けされたポリペプチド配列；及び

(c) 前記DNA配列のいずれかにより発現に対してコード付けされたポリペプチド配列にコード付けするDNA配列

から成る群から選択される。

好適には、本発明のDNA配列は、第3図の1-222(追加N-末端メチオニンを含む又は有しないこれらの一部に対して示される配列を有するポリペプチドにコード付けする。更に好適には、本発明に対する列は、より小さいタンパク質の製造を可能にする為、成トランスメンブラン部分に対してコード付けする部分を、それから、例えば、約682-715ヌクレオチド除去する。第3図のもの(アミノ酸1-222)に比較されるだろう。最も好適には、本発明のDNA配列は、タンパク質又はCD2に結合するペプチド、T-リンパ球のレセプターに対してコード付けする。更に好適に

明のLFA-3と誘導体は、T-リンパ球の表面のCD2に結合する。最も好適には、これらはまた、T-リンパ球と他の細胞の間の結合を防止する。

本発明のDNA配列はまた、LFA-3又はこの誘導体の製造に有用であり、これらは、これらにより、これらのDNA配列で変換される単細胞培養において、発現にコード付けされる。この分野で周知のように、本発明のDNA配列の発現に対して、DNA配列は、適切な発現ベクターにおいて発現制御配列に作動的に結合され、かつ適切な単細胞宿主を産生する為にこの発現ベクター中に利用されるべきである。

本発明のDNA配列の発現制御配列に対するこのような作動的結合は、DNA配列の上流の正しい塩基対における翻訳開始符号の提供を含む。若し発現されるべき本発明の特別なDNA配列が、例えば、フェニルアラニンで開始する成熟LFA-3のようにメチオニンで開始されないならば、開始符号は別のアミノ酸において起こり、メチオニン-生成物のN-末端に位置される。一方、このようなメチオニン-含有生成物は、本発明の組成物と方法に適用に利用されて良く、使用する前にメチオニンを除去するのが一般的により望ましい。このようなN-末端メチオニンをメチオニンで発現されるポリペプチドから除去する方法は、技術分野において提

高範囲の各種宿主/発現ベクター組合えは、DNA配列を発現するのに利用される。有用な例としては、例えば、染色体の、非染色体の及び合成のDNA配列から成り、このようなDNA配列は、SV40の各種誘導体、知細菌プラスミド、例えば、col E1、pCR1、pUC222及びこれらの誘導体を含む大腸菌からのプラスミド、宿主領域プラスミド、例えば、REP、フージムDNA、フージムの多くの誘導体、例えば、BM989、及び他フージム。例えば、Y19及び繊維状一本鎖DNAフェーラスミド又はその誘導体のような酵母プラスミド、フージムDNA又は他の発現制御配列を利用する為にもたプラスミドのようなフェーラスミドである。動物細胞に対して、発明者等は、好んでプラスミドpGEM3、アタリス2の主要プロモーターを含むプラスミドを使用

更に、どの高範囲の各種発現制御配列-CD2、作動的に結合する時にこのDNA配列の発現を制御するこれは本発明のDNA配列を発現する為には、これらのペ使用して良く。このような有用な発現制御配列は、SV40又はアデノウイルスの初期と後期のプロモーターシステム、lucシステム、lac又はIREシステム、フェーラスベクター及びプロモーター領域、ldコート

は、好んでアデノウイルスの主要期のプロモーターから誘導した発現制御配列を使用する。

動物細胞の各種単細胞宿主細胞も、本発明のDNA配列を発現するのに有用である。これらの宿主は、大腸菌、シェーデルモナス、バシラス、ストレプトミセスの菌株、イーストのような菌類、及びCHO及びマウス細胞のような動物細胞、COS1、COS7、BSC1、BSC40及び3T10のようなアフリカマドリサル細胞、及びヒト細胞及び組織培養の動物細胞のような周知の原核細胞と真核細胞宿主を包含する。動物細胞発現に対して、発現宿主はマウス細胞を好む。

勿論、総てのベクター及び発現制御配列が、本発明のDNA配列を発現するのに十分に巧しく作用するとは限らないことを理解すべきである。また総ての宿主も、同じ発現システムで充分に巧しく作用しないであろう。しかし、当業者は、不適切な実験をすることも無く、かつ本発明の範囲から離脱すること無く、これらベクター、発現制御配列及び宿主の間で選択をすることが出来る。例えば、ベクターを選択する際に、宿主は、ベクターがその中に複製しなければならないことを考慮されなければならない。ベクターのコピー番号、このコピー番号を制御する能力、及び抗原性マーカーのこうしたベクターにより符号化されるなどの他のタンパク質もまた考慮されなければならない。

発現制御配列を選択する際に、各種の因子もまた考慮されなければならない。これらは、例えば、システムの細胞の速さ、その細胞受け品さ、及び本発明の、特に電位二次構造に関して特別なDNA配列との適合性を含む。細胞宿主は、選択されたベクターとの適合性、宿主に対して本発明の

ペプチドは、癌細胞とのこれらの相互作用を妨げることにより細胞溶解Tリンパ球活性を防止するのに悪性である。これらは、ヘルパーT細胞と抗原提示細胞の相互作用を妨げる為に、免疫応答に対して同じ効果を有する。更に、本発明の化合物は、癌細胞と免疫抑制の癌の標的細胞に、又はリンホカインのような分化薬に、特異的に標的とするT細胞に使用して良い。更に好適には、本発明のポリペプチドの可溶性誘導体は、Tリンパ球のCD3部位を飽和するのに利用して良く、かくしてT細胞活性化を防止する。この効果は、移植片対宿主疾患において、自己免疫疾患、例えば、慢性関節リウマチにおいて、及び同種異系移植拒絶反応の防止において明白に大きな有用性がある。更に、本発明のポリペプチドは、これが、ヒト以外の種に起こる抗体であるよりも、ヒトにおける免疫応答を惹起しようも無い為に、LFA-3又はCD3に対するモノクローナル抗体以上に好まれる。本発明の脂質組成物は、このようなポリペプチドの免疫抑制又は促進に有効性、及び薬学的に受け入れ可能な宿主から代表的に成る。本発明の治療方法は、これらの組成物により薬学的に受け入れ可能な方法において患者を治療する段階から成る。

これらの治療に使用する為の本発明の組成物は、各種形態を取る。これらは、例えば、錠剤、丸剤、粉末、液体

DNA配列により発現にコードされた組成物の毒性、生物活性、タンパク質を正確に折り畳む宿主の能力、誘発性、及び本発明のDNA配列により発現にコードされた組成物の特異性の容易さを考慮することにより選択されなければならない。

これらのパラメーター内で、当業者は、発現又は複製の動物細胞、例えば、マウス細胞培養で、本発明のDNA配列を発現するであろう各種ベクター/宿主の組合せを選択して良い。

本発明のDNA配列の発現により製造されたポリペプチドは、発酵又は動物細胞培養から単離され、かつ分野で周知の各種方法で精製されて良い。このよう精製された、各種因子、生体物がいかにして製造されそれが可溶性か不溶性かどうか、及びそれが標的されるか又は細胞を破壊することにより単離しなければいかどうかのような因子に左右される。しかし、当本発明の範囲から離脱することなく、適切な単離とを選択して良い。

本発明のDNA配列、例えば、*mol-LFA-3* (第1図) 又は *LFA-3* (第8図の *アミノ酸1-223*)、好適なより小さく可溶性でない誘導体、又は更に好適な可溶性誘導体の発現により製造されるポリペプチド本質的にヒト細胞の他のタンパク質を含まず、かつウイルスとエイズウイルスのようなウイルスによりでない。

これらのポリペプチドは、免疫応答を遮断大する組成物と方法に有用である。例えば、本発明

一回又はそれ以上、患者に投与されるだろう。

一般的に、本発明の脂質組成物は、他の脂質性ポリペプチド (例えば、 α -インターフェロン) で使用されるものと同じ方法と組成物を使用して与えられて良い。従って、ポリペプチドは、凍結で貯蔵され、投与前に殺菌液中で戻し、かつ希釈下、静脈内又は経腸内の経路のような普通の方法で投与される。

本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体、診断組成物と方法にも有用であって、T細胞又はCD2細胞を抽出し、又は自己免疫疾患、移植片対宿主病及び同種異系移植拒絶のような過剰又は抑制する免疫の過程をモニターする。

最後に、本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体は、B及びT細胞を分離するのに有用である。抗体抗体に結合する時に、本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体は、BとT細胞を分離するだろう。

本発明がより良く理解される為に、次の図を参照する。これらの実施例は、説明の目的のものとして提供される。加える方法においても、本発明の範囲内のもので解釈されるべきでない。

セツから入手)からトリプシン断片を生成し、かつ表1図に示される部分アミノ酸配列を決定するのに利用した。

発明者等は、(48.)、50.法によるハイブリドーマ培養とタンパク質Aアフィニティークロマトグラフィーとによるハイブリドーマ培養上清からモノクローナル抗体(MAb) F52/11(サンチエズ-マドリッド等、前記)を精製した。次いで発明者等は、この精製MAbを使用して次の精製に使用する為の親和性カラムを調製した。

発明者等は、カトナカイスの方法[マーチ等、Biochem. Biophys. Res. Commun. (アナリティカル バイオケミストリー) 第68巻、第149頁(1974)]の方法の改良によりセファロースCL-4Bに対して精製MAbを結合した。発明者等は、洗浄セファロースCL-4B(ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン)を100g、CO₂中の40mg/ml CNBrで氷上10分間活性化し、次いでそれを蒸留水と0.1M HClで洗浄した。発明者等は、活性化セファロースを濾過して得たケーキとし、次いでそれを0.05M NaClと0.1M NaHCO₃(pH8.4)中の2-tg/ml IgG(LFA-3 MAb又はマウス IgG)と共に洗浄抗体溶液へ添加した。次いで発明者等は、この分散体を回転しながら30時間混合し、次いでエタノールアミン50mMの添加と1時間の静置により親和反応性を封鎖した。発明者等は、280nmにおいて吸光度を測定することにより凍結結合抗体に対して上清を検査した。結合は普通98%のオーダーであった。次いで発明者等は、カラム中にMAb-結合セファロースを詰め、次いで親和クロマトグラフィーに対して使用する前に、それを1サイクルのpH11とpH2緩衝液(下記参照)で洗浄した。

発明者等は、LFA-3を溶出する為にオクテル-β-D-グルコピラノサイド(OG)(カルピオケミー)を使用した時に、全ての段階は、高pH洗浄の後まで同じであった。この時点で、発明者等は、カラムを5倍量の磷酸緩衝液(pH7.2)、1% OGを含む0.15M NaCl、で洗浄し、次いでグリシン緩衝液(pH8)、0.15M NaCl、1% OGを使用してLFA-3を溶出した。溶出プロフィールは、トリトンX-100で得たものと同じであった。発明者等は、続いてこのLFA-3を¹²⁵I-LFA-3 MAbで「ドット・プロット」検定法[バックス等、Anal. Biochem. (アナリティカル バイオケミストリー) 第119巻、第142頁、(1982)]を使用して半定量的な方法で測定した。

トリプシン消化とアミノ酸配列決定に対して精製LFA-3を調製する為に、発明者等は、N-グリコシダーゼFを調製して、供給者(ゲンザイム、ボストン マサチューセツ)の指示に従って、僅かに改良した方法で脱グリコシレートした。先ず発明者等は、エタノール沈殿(トリトンX-100)又は超遠心分離(OG)によりデタージェントからLFA-3を分離した。次いで発明者等は、LFA-3を25μlの0.5% SDS、0.1% 2-メルカプトエタノールと共に5分間沸騰することにより溶出した。次いで発明者等は、酸性LFA-3を、最終密度50μg/mlにおいて、1%トリトンX-100と10mMの1,10-ブエナントレオンを含む50mM

発明者等は、前記の親和クロマトグラフィー等、前記)によりトリトンX-100で可溶性にした後L洗した。発明者等は、全ての段階を4℃で実施した。

発明者等は、応用期間を過ぎたヒト赤血球カサ十字(ニーダマン、マサチューセツ)から得た等価、1ユニットの全血液からの細胞をPBS(pH7.2)で洗った。次いで発明者等は、充満細胞を約500mlとし、次いで撹拌しながら赤血球を1%トリトンX-1ニールメチルスルホニルフロライド、5mM コードブド及び0.1%トリプシン阻害剤エニット/n(アプログ)加した。1時間後、発明者等は、懸液物を150,000gで心分離した。次いで発明者等は、透明液を流し、2つのカラムに順々に送った。(1) 送らかの不純物かつどの粒状物も通過する為にマウス IgG-セファローム(20g/mlで2x1)、及び(2) LFA-3 MAb-セファローム(10g/mlで5-10ml)。発明者等は、LFA-3 MAb-セファロームを、3カラム容量の50mM磷酸ナトリウム(pH0.25M NaCl、0.1%トリトンX-100、次いで5カラム容量トリニチルアミン(pH11)、0.25M NaCl、0.1%トリト及び再び2カラム容量のpH7.2の緩衝液で、捨て1洗で洗浄した。次いで発明者等は、懸液LFA-3を5カラムの50mMグリシンHCl(pH3)、0.25M NaCl、0.1%トリトで20ml/80間の流速にて溶出した。発明者等は、溶出液を1%トリトX-100(pH8.4)、0.1%トリトX-100中に集めより中和した。

発明者等は、調製用SDS-PAGEと電気泳動でLFA-3(25Kd)を処理して高度に精製したN-グリコサナ製した。発明者等は、アルゴン下16℃で3分間、N-アセ-処理LFA-3(約350μg/ml)を250mMのN-エチルモリリンアセテート中の5mM EDTA、1mM EDTA、0.2% SDS(pH8.25)し、次いでそれを貯所で24℃にて30分間、11mMコードブドでアルキル化した。発明者等は、生成物(-3)を、0.3% SDS、250mM N-エチルモリリンアセテ(pH8.25)で平衡させたセファラックスQ-25でゲル3ことにより洗脱し、それを凍結乾燥した。次いで乾燥、凍結乾燥したLFA-3を10mlの無水エタノール、-20℃で1日間貯蔵し、LFA-3を4℃で30分間800gで心分離することにより溶出した。発明者等は、沈殿物の1% H₂NHCO₃中に溶解し、次いでそれをベビンJBE(ジャーナル バイオロジカル ケミストリー)第242巻、(1986)に記載のようにしてTPCK-トリプシンで消化した。発明者等は、消化物を凍結で凍結乾燥まで酸性とし、直ぐに狭い口径C₁₈カラム(アグア-0.6, 21x10cm、ブワウリー フラップス)で逆相HPLCマトグラフィーにより断片を分離した。発明者等は、たペプチドを、流速0.3ml/分(0.5分の分画を収集)で

479A ガス相レークセンサを使用する自動エドマン分解[ヘビクタ等、18C、(グーナル バイオロジカル ケミストリー) 第18巻、第1600頁、(1981)]に付した。発明者等は、アブライド バイオシステムズ 180A PTH 分析機を使用するオンラインでPTH-アミノ酸を測定した。相違タンパク質の配列決定は、第1図に示すように38位のアミノ酸の配列を与えた。

オリゴヌクレオチド プローブの合成

発明者等は、最少核酸塩量により特徴づけられるLP1-3のアミノ酸末配列(第1図の下線部参照)からの領域に対してコード付けする逆転写オリゴヌクレオチドRNAプローブの2つのブールを、アブライド バイオシステムズ 20A DNA 合成機により化学的に合成した。各々の選択したアミノ酸配列に対して、発明者等は、総ての可能なコドンへ相補のプローブのブールを合成した。発明者等は、cDNAのみならずDNAの対応配列へこれらのハイブリッド形成を可能にする非転写プローブを合成した。発明者等は、(γ-³²P)-ATPとオリゴヌクレオチド カナーゼ[マックスマとギルバート、*Proc. Natl. Acad. Sci.* (プロシーディングス アカデミー サイエンス) 第74巻、第560頁(1977)]を使用して発明者等のオリゴヌクレオチドプローブに標識した。

第2図に示すように、オリゴヌクレオチドブールLF1は、32-ホールド塩量を持つ39-マーであった。プローブブールLP2-5は、384-ホールド塩量を持つ20-マーであった。しかし、その塩量を縮小する為、発明者等は、G1yに対する縮小したコドンを含むサブブールに対してその4つの可能なヌクレオチドの一つに附接することにより、96-ホ-

ールド塩量の4他のサブブールの各々の中にこのブールした。次に発明者等は、取説したように、ヒト肝臓有するノーゼン プロット法に対して [クオルナー *Nature* (ネイチャー)、第326巻、第77-81頁(1986)]、ブールのハイブリッド形成により、不正確な配列3個のブールから正確な配列を含むサブブールを選ヒト毎個55A中の1860ヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドプローブサブブール正確な配列を含んだことを暗示した。従って、発明者等の各サブライブラリーをスクリーニングすればとブールLF1を使用した。

2.1.18ホールド塩量リンパ球cDNAライブラリーの標識

発明者等の末梢血リンパ球(PBL)cDNAライブラリーを調製する為、発明者等は、単球を陽性する一選介して白血球移動器によりPBLを操作した。次いで、非粘着細胞を18V/cm 1000V/cmと10μg/ml PMAで2標した。発明者等は、フェノール抽出を使用して細胞からRNAを抽出し[マニアチス等、*分子クローン* 187頁(コールド スプリング ハーバー ラボラトリ、次いで一選のオリゴdTセルローズ クロマトグラフ、カボリイ、cDNAを調製した。発明者等は、このRNAをホル沈降し、それを高純度塩酸抽出し、次いでこのRNAをH₂O(0.5±6/μl)中に再分散した。発明者等は、CH₂最終濃度)及びβ-メルカプトエタノール(0.5μg/μl)にて10分間処理した。次いで発明者等は、メチルしたRNAを、42℃で0.1M トリス-HCl(pH8.3)、0.01M

パナジル炭合体、5μMオリゴdT、20mM KCl、1mM DCTP、dGTP、dTTP、0.5mM dATP、20mM KCl、1mM dCTP、dGTP、dTTP、0.5mM dATP、総容量50μl中の2μCi[α-³²P]dATP及び30U、5μM RNase 逆転写酵素(セイカダグ アメリカ)へ添加した。発明者等は、混合物を2分間室温にて、次いで5時間4℃にて培養し、次いで0.5M EDTAの1.5μlを添加することにより反応を停止させた。

発明者等は、反応混合物を等容量のフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、水相層を0.1容量の10% BSAと2.5容量のEtOHで2回沈降させ、次いで真空下に乾燥した。cDNAの収量は1.5μgであった。

発明者等は、合成中にDNAポリメラーゼI大型断片を使用した以外は、オカヤマとベルグ[*Nat. Cell. Biol.* (モレキュラ セルラー バイオロジカル) 第2巻、第161頁、(1982)]及びグブラーとホフマン(遺伝子、第25巻、第283頁、(1983))の方法に従って第2鎖を合成した。

発明者等は、80μg T4緩衝液[0.033M トリスアセテート(pH7.8); 9.066M 酢酸カリ; 0.01M 酢酸マグネシウム; 0.001M DTT; 50μg/ml BSA], 5μg RNA、1ユニットのRNAポリメラーゼII、50μg/ml BSA、2ユニットのクエン酸リガーゼ、0.315mM dATP、dGTP、dCTP、dUTP、10ユニットのクエン酸リガーゼ

れをエタノール沈降させた。収量: 80.5μg cDNA。

発明者等は、標準方法を使用して、二本鎖シカンカ-23/35に結合した。

5'-AGTTCGAGCTCCGCGCGGCCG3'

3'-GCTCGAGCTCCGCGCGGCCG5'

次いで発明者等は、5500 セフアクリル カラムでEG cDNAとより長い断片に大きく分別し、それをECORIIとXbaIに結合した。発明者等は、製造者の協定付随でオガバク(許諾遺伝子)中に結合反応物の一定量を発明者等は、充填ファージを使用して、大腸菌BNI1感染させ、次いで増殖の為に細胞を塗布した。得るブラリーは、1.185×10⁶の独立相換え体を含んでいる。

ライブラリーのスクリーニング

発明者等は、ヒト肝臓 cDNAライブラリーをスクリーニング等、*Proc. Natl. Acad. Sci.* (プロシーディングス アカデミー サイエンス)、第82巻、第7711-7715)、及びベントンとダイビス[*Science* (サイエンス) 第180巻、(1977)]のブランク ハイブリッド形成スクリーニング技術を使用して、上記調製したPBL cDNAライブラリーをスクリーニングした。

37℃で8時間培養した後、発明者等は、プレートからフィルターを引き上げ、これらを0.5M NaOH/1.5M KSCNのブールに5分間置くことにより溶解し、次いでこれらと同じ緩衝液中に5分間浸漬した。発明者等は、これらを0.5M トリス-HCl (pH 7.4)、1.5M KSCN中に、5分間づつ8回浸漬することによりフィルターを中和し、これらを1M NaOH中で2分間洗浄し、次いでフィルターを乾燥し、次にこれらを80℃で2時間ベークした。

発明者等は、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィコル (MW400,000)、0.2%牛血清アルブミン、0.05%トリス-HCl (pH 7.5)、1M塩化ナトリウム、0.2%ピロリン酸ナトリウム、1% SDS、10%硫酸デキストラン (MW500,000) 及び100 µg/ml BSA中で、オリゴヌクレオチドプローブLP1に対してフィルターに予備ハイブリッド形成及びハイブリッド形成した。発明者等は、オートラジオグラフィによりハイブリッド形成するλ-cDNA配列を検出した。

発明者等は、PBLライブラリーから12正ファージをかつ精確ライブラリーから12正ファージを始めに選択した。次いで発明者等は、これらのクローンと、同じプローブを使用して低い密度でこれらを複製したプローブを再スクリーンした。

発明者等は、このクローンから単離したDNAをEcoRIで消化し、次いでこれらをサブクローン技術 (E.Y. サブク、J. Mol. Biol. (ジャーナル モレキュラー バイオロジー) 第88巻、第338-342頁 (1975)) を使用してオリゴマープローブLP1及びLP2に対してこれらにハイブリッド形成した。次いで発明者等は、更に真核ライブラリーの2つのクローン

を使用した。pHKO1の構成は、NcoI消化と4つの20-ヌクレオチド長プローブ: PH-A、PH-B、PH-C、及びPH-Dを使用する挿入した断片の塩基の配列決定をチャーチ・ギルバート研究法により可能にする。第5図参照のこと。

2つの重要な配列決定の結果が、チャーチ・ギルバート方法により発明者等のサブクローンからえられた。一つの実験において、発明者等は、224bp EcoRI断片を結合するEcoRI部位を越えて配列を決定する為、LP19とLP11 (第5図) に関係無くλHT16からPvuII消化DNAを証明した。このことは、このファージの2つのEcoRIサブクローン (pHT16HとpHT16L) の分析は、小さいEcoRI断片への5'又は2つのEcoRI断片の間の5'のいずれかの配列を見落としていた可視性を積極的に反証した。発明者等はまた、このEcoRI部位を正確に貫するHclIサブクローン形成したpP20の分析によりこの結果を確認した。発明者等はまた、PvuIIでpP20を消化し、かつハイブリッド形成プローブとしてLP10 (第5図) を使用するチャーチ・ギルバート方法により断片の配列を決定した。このことは、挿入断片の5'末端はλHT16の5'末端と全く同じであったことを証明した。

第9図は、ファージλHT16のcDNA挿入断片のDNA配列を示している。これはまた、LPA-Bに対してコード付けす

(λHT16とλHT19)からのDNAとPBLライブラリーからクローン(λP26とλP24)からのDNAをDNA配列決定法性質を調べた。

cDNAクローンの配列決定

発明者等は、配列分析を促進する為、λHT16とλP26からのEcoRI消化したDNAを、pB801クローン化した。λHT16は、2EcoRI断片を有して前者等は、プラスミドpHT16HとpHT16Lに於けるpB801断片をサブクローン化した。λP24の総ての挿入断片EcoRI断片上に含まれている。サブクローン化の後者等は、普通に使用される技術を使用してベクター部位又はSmaI部位を使用した。

発明者等は、制限消化により合成ポリリンを除去し、かつそれを新しい合成断片で置換すること配列決定プラスミドpB801を構成した。pB801プラスミドは、SmaIを、複製開始点を付与し、かつアンピシリン性を導くものであるが、変性化なかった。pB801の合成部分は第4図に示されている。

発明者等は、マックサムとギルバートの方法 Maxam-Gilbert (酵素学方法) (1980) により発明者等のクローンのDNA配列を大部分決定した。しかし、後述の如くして、発明者等は、チャーチとギルバートの関連 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (プロシーディングス オブ ナショナル アカデミー サイエンス 米国) 第76巻、第1991)

CHO細胞中にLPA-3 HT16 cDNAの発現

下記p24HT16LFA882の960bp EcoI-MaeI断片発現ベクターを与える為、B8812発現ベクターのSmaI中に挿入する。ベクターB8812は、インビトロインクナルカルチャーコレクション、C11P、ハモンド・ストランド、ランタム、マリーランド、21990年5月24日で預けられており、かつ受け入れ番号1Y1-J0110でされている。B8812 (タイトル、Cell (細胞)、第45巻、第980) において、挿入断片DNA配列の発現は、アデノ24断片プロモーターの制御下にある。p24HT16LFA882は、480bpEcoRI断片をプラスミド部分を含むp24の大型断片と結合することにより形成された。p24のEcoRI断片は、第9図の塩基対1-223のDNA配列に一致する。HT16-CHO細胞系を確立する為、発明者等は、1x10⁶ (2PBR) 細胞 [カジンとカルバン、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (プロシーディングス ナショナル アカデミー サイエンス) 第77巻、第4816頁 (1980)] を、180 µgのKpnI線状化B8812の5101線状化pAD226 DNA [カウフマンとシャープ Cell, Biol. (モレキュラー セル バイオロジー)、第1304頁 (1982)]、及び980 µPDに設定したキャパシタ0.200Vにてピオラド (リッチモンド、カルフォルニア)

MEMブラス200nm、400nm又は800nmメートルスケールのいずれか中にて成長させた。コロニーは、200nmメートルスケール中で最も良く成長し、このコロニーから、発明者等は、何々のコロニーを単離し、免疫活性化細胞ソーサー(FACS)(ベクトン・ダイキン・マウンティンビュー、カルホルニア)で間接的免疫蛍光の強度を測定することによりLFA-3の発現に対して、かつ下記のようにロゼティング(細胞粘着)に対して検定する為に、100mmプレート当たり 1×10^5 細胞までこれらを成長させた。

FACSにより分析する為に、各BT16-CROメートルスケールクローン当たり 1×10^5 細胞と制御CHO細胞は、4℃で15分間、ヘンクのSSS(スペルアクト)緩衝液、0.5% BSAと共に培養することにより、組織培養皿から除去された。次に分離した細胞は、ペレットとされ、50μlのPBS緩衝液(1xPBS、0.3% BSA、0.1%ナトリウムマジド)中に再分散し、15分間氷上で100μlモノクローナル抗体TS2/9(1.2μg/ml)(チム・スプリングルの贈り物)で培養した。次に発明者等は、10μlのPBS緩衝液で2回細胞を洗浄し、適量分離液でペレットとした。この細胞ペレットを、PBS中の1:50希釈PC1(免疫共役細胞精製F(ab')₂断片ヒツジ・アンチマウス IgG(カベル、バイオケミカル、メンシルバニア)の100μl中に再分散し、次いで30分間氷上で培養した。細胞を適量分離液でペレットとし、適量のPBSを細胞ペレットを、1xのPBS(スペルアクト)緩衝液中に2回再分散することにより除去した。次いで発明者等は、細胞を1xPBS800μl中に再分散し、次いでFACSにより蛍光強度を決定した。5つのクローンが、対照CHO細胞とLFA-3発現に關して均一細胞集団よりもより高い蛍光を示した。

除まで希釈することによりクローンを選別した。8つの耐性クローンを繁殖させ、前記したようにFACS分析によりLFA-3表面発現に対して検定した。発明者等は、総ての8つのBT16-R1.1クローンが、R1.1細胞より約25倍のレベルでLFA-3を発現したが、しかし総てはLFA-3発現に關して均一細胞集団を示したことを見いだした。

更に発明者等は、FACS上の高い発現度の2つのクローン-R13とR15-を選別した。各々のクローンの1x10⁵ BT16-R1.1細胞を、PBS緩衝液(1xPBS、0.3% BSA、0.1%ナトリウムマジド)中、氷上で45分間、100μl TS2/9 Abで培養した。細胞をペレットとした後に、発明者等は、10μl PBS緩衝液中に再分散することにより、ペレットを2回洗浄し、次いで細胞ペレットを100μlの1:50希釈PC1中に再分散した。氷上に30分間置いた後に、細胞を洗浄し、次いで200μl 1xPBS中に再分散した。BT16-R1.13とR15の選別した均一集団中でLFA-3の表面発現は、JY細胞のものの16%である。

次ぎに発明者等は、R1.1細胞中に発現したようなBT16-cDNAからのLFA-3が、C92 cDNA(L114)(キャサリン・ヘンションの贈り物)を発現する細胞と、かつBT16-CROに対して前記したような同じ方法を使用するジュルカット細胞(チム・スプリングルの贈り物)とロゼティング(細胞粘着)テストの結果の相

次ぎに発明者等は、CHO細胞中に発現したH LFA-3が、ロゼティング分析によりCD2免疫細胞に結合かどうか試験した。発明者等は、対照CHO細胞と、つまり 2×10^5 細胞の細胞密度で5ウェル組織培養プレート8.6cm²ウェル中でLFA-3(BT16-CRO130)を発現するCHO細胞を培養させた。プレートを、4℃でソノバール遠心力で2分間(400rpm)で回転した。細胞を2時間4℃で培養細胞をRPMI1660メディアウムで洗浄して過剰のジュルカット細胞を除去した。ジュルカット細胞は、細胞培養中に、LFA-3発現のBT16-CRO130細胞とロゼティング形成。発明者等は、BT16-CRO130中のLFA-3の表面レベルをJYリンパ芽細胞的細胞(チム・スプリングルの贈り物)の発現レベルと、 2.5×10^5 JY細胞、CHO細胞及びBT16細胞を使用して、前記したようにFACS分析を使用し細胞系の相対的蛍光強度を比較することにより比較BT16-CRO細胞は、JY細胞より6倍高い蛍光強度を示した。

R1.1細胞中にLFA-3 BT16-cDNAの発現

1.6×10^5 R1.1細胞を、前記したような90μlに溶した発現ベクター-BG8、10μg HaeI線状化したプラスミドpCP-DNA[P.プロスベルト等、Gene (1982)]、及び前記したようなクロノレクション(280μl、560μl)により300放射線したサケ精子DNAと共に共導入した。RPMI1660 (log-ml G418)中の移入細胞を選択した後に、発明者等は100μl RPMI 1660メディアウム プラス log/ml G418をウェル・マイクロタイタープレート中、ウェル当たり

細胞の細胞表面上に発現されることを示した。BT16-細胞又は未移入R1.1細胞は、未移入マウス細胞と異なり成せず、これらの細胞の相互作用の特性を示す。

L-細胞中にLFA-3 BT16-cDNAの発現

発明者等は、 1×10^5 L-細胞[C.P.タルキJ. Immun. (ジャーナル・イムノロジー)、第181巻、第2(1983)]を、溶記80μlをHaeI線状化BG8プラスミドDNA 300線状化pCPプラスミドDNA(プロスベルト等、上(移入細胞を選択するのに使用出来る)イグン・キナ・プラスミド)、及び前記クロノレクションによる選別したサケ精子DNA80μlと共に共導入した。細胞は、次いで100μlペトリー皿に移した後に、発明者等は48-72時間、非選択的メディアウム(DMEM)中で培養した。次いで移入された細胞を、100mm当たり 1×10^5 細胞密度で、DMEM+ヒポキサンチン・アミノプタリン・チ(HT)中で選別した。発明者等は、14日後に13クローするチミジンチナーゼを拾い上げ、これらを100μl当たり 1×10^5 で引3伸ばし、前記したようにFACS分析LFA-3発現に対して検定した。11個のBT16-Lクロー

題したが、その理由は、これらのクローンは、LFA-3発現の同一細胞集団を示したからである。BAT-TH84メディアウム中に選別された6つのクローンは、HT16-L-10A、10B、10C、10D、10E、及び10F-1は、PAC6分析によりLFA-3発現に対して検定された。発明者等は、対照CHO細胞の蛍光強度より35倍高かったクローンHT16-L-10C以外は、20-30倍の蛍光強度を示す極めてのクローンを見いだした。

発明者等はまた、HT16 cDNAからのLFA-3が、L-細胞中に発現された時に、H1.1細胞中に発現されたLFA-3に対して上記同じロゼット形成の検定を使用して、他の細胞に粘着するかどうか試験した。発明者等はロゼット形成を観察した。

大腸菌中にLFA-3の発現

大腸菌中にLFA-3 cDNAを発現する為に、発現ベクター-pLFA31rc1を構築した。このベクター(pKK238-3の誘導体)は、成熟LFA-3タンパク質を発現する。シグナル配列に対してコード付けするHT16 cDNAのDNA配列は、削除された。pLFA31rc1を構築する為に、プラスミド pKK238-3 [E. アマンとJ. プロフィウス, *Gene*, (遺伝子), 第40巻, 第183頁, (1985)] を制限酵素HcoIとBlnIで消化し、かつpLFA3HT16の出発100塩基対A2/B1063の断片と2本鎖リンカー-LF21-22へ結合した。このリンカーは、HT16 cDNAの塩基対101-175(A22部位へ)の間の配列を置換する(第1表)。

次に細胞は、32°Cで0p.p.m.まで、14 LB + 50 µg/mlアンピシリン中で増殖させた。LFA-3の発現は、2時間24h IPTGで誘導された。細胞は、30分間1000rpm/4°Cでペレットにされた。発明者等は、このペレットを、10mlトリス緩衝液当たり100細胞ペレットで25mMトリス(pH7.0)中に再分散し、細胞圧力10,000-14,000psiでフランス プレッシャー セル プレス中に溶解させた。次に膜分面を、4°Cで30分間10,000rpmにてSS31 ソルバール中で遠心分離により可溶性タンパク質から分離した。膜ペレットを、25mMトリス pH7.0の1ml、22アリコートの上清中に再分散させ、次に膜ペレットを、15%SDS-或はPAGE上で電気泳動させた。膜ペレットを60%緩衝液に溶解し、タンパク質は、SDS-PAGE、汚染クローマー及びサブユニットタンパク質の配列決定用のゲルから切除されたLFA-3とにより分離された。発明者等のアミノ酸配列決定は、NFSQQIYGYYIGKVT-LFA-3とFSQQIYGYYIGKVT-LFA-3としてN-末端配列を確立し、これはヒト赤血球から精製したヒトLFA-3に対して決定したN-末端配列に一致した [バルナー等, *J. Exp. Med.* (ジャーナル エクスペリメンタル メディシン), 第166巻 第22頁(1987)]。従って、この遺伝子により製造した生成物は、メチオニンを有する又は有しないN-末端を有する。

LF21:

3' CATGTTTTCGCCAAGCAATATATGGTCTTGTCTATCGGG
TAACTTTCCATGT ACCAAGCAATGTGCCCTT
ATAAGAG 3' 19 ser

LP22:

5' GACCTCTTTTAAAGCCACATTCCTTGTCTACATGGAAA
ACATTCCTTACACACACACCATATATTTGT
GGCAAAA 8' 78 ser

発明者等は、得られた組換え発現ベクター細胞を形質転換した。pLFA31rc1で形質転換した大腸菌、1.0へ成長させ、続いて1時間14h IPTGで誘導遠心分離により細胞を収集した。細胞を33中に1当量の0.2 OD₆₀₀を除去した。次いで発明者等は、膜によりペレットとし、この細胞ペレットを60%の緩衝液50 µl中に再分散し、次いで30分間再分散した試料を、電気泳動によりタンパク質を分離する2変性ポリアクリルアミドゲルに装填した。LFA-3を、タンパク質をニトロセルロース膜へ電気泳動して抗体のγ-LP1-2、Y63(キム スプリングゲルの贈り物)の1:1000希釈で膜を培養した。発明者等は、抗-抗体は25 %タンパク質を検出し、形質転換細胞が異なれたことを示したことを観察した。

[LFA-3V]欠失

50 µgのプラスミドpHT16LFA3 DNAを、32°C制限酵素BclIの100ユニットで消化した。発明者等は、アガロースゲル上電気泳動によりホストプラスミド、消化プラスミドを分離し、ゲルから切除し、電気泳動のアリコートの50 µlのpHT16LFA3プラスミドDNAを、BclIと100ユニットBlnIで32°Cにて1時間消化した。プラスミド中の大部分のLFA-3 cDNA配列を切除してベクターを、1%アガロースゲル上で電気泳動し、BlnI断片から分離し、切除し、次いで電気泳動し、発明者等は、欠失を導入する為に、オキチドLP17を使用した。これは、第3図に示した1列の塩基対682で開始する21ヌクレオチドと塩基対開始する22ヌクレオチドに相当する43 mer(第1表)である。

LP15:

8' TAGGGTTCTGTCGCGCTGTAAGCTTACTTACCAATAAGAC

LP17:

(第11表続き)

LF28:

5' CAGGGCCCGCCCGCGTCCGACCAAC 3' 80 not

1

このオリゴヌクレオチドが、一本鎖HT16cDNAに対してハイブリッド形成される時に、これはHT16cDNAの111塩基対の外にループ形成するだろう。電気泳動Sealの20pセルとDeoRI/HindIII断片の20pセルは、燐酸化LP17の10pセルと混合され、次いで100mM KCl、8mM トリス(pH 6.5)及び50mM MgCl₂中で5分間30℃にて反応させ、87℃で1時間、4℃で1時間、次いで氷上で10分間培養することにより再変性された。反応混合物の半分に、発明者等は、0.5μg イリガゼ、1μM ATP、1μM クレノウ及び50mM BTPを追加し、次いで混合物を一晩15℃で培養した。反応混合物の他の半部分を、MC1051速格細胞中に転移させた。欠失LFA-3 cDNAを含むコロニーを、次のように、LF17にハイブリッド形成することにより同定した。形成転移したMC1051コロニーを、ニトロセルロースフィルターに移し、溶解し次いでEDBAを0.5M NaOHで処理することにより変性した。ニトロセルロースフィルターは、一晩85℃で、1x10⁵cpa/ml ³²P-キナーゼオリゴヌクレオチド LF17を含むP55中でハイブリッド形成させた。フィルターを0.1x65C(0.015M 燐化ナトリウム、0.0015M グエン酸ナトリウム)中で洗浄し、1-膜フィルムに露光させた。正コロニーを、拾い上げ次いで37℃で増殖し、次いで溶解した。次いで発明者等は、DNAを調製した[マニアティス等、"分子クローニング 実験室マニュアル" コールドスプリング ハーバー(1982)参照]。

次に発明者等は、総ての除去したLFA-3 cDNAを、選択標的を更に増殖する発現ベクター中に挿入した。発明者等は、組込み中にLFA-3遺伝子に近接する同じプラスミド上に、選択標的を有することは、これら2つの遺伝子の共通点と、従って、これらの共選択を確実にすることであることを信じる。発明者等は、発現ベクターpJ03-p2を使用した。ベクターpJ03-p2は、1985年5月28日に、メリーランド州、リンチカムのインビトロインターナショナル、カルチャーコレクションに預けられ、受け入れ番号171-10171が記録されている。LFA-3M17、M16及びM23の構築のために、pJ03-p2ベクターを制限酵素SalIにより線状化し、クレノウにより平滑末端とし、クレノウ-プランド末端PstI断片のpLFA3M17、pLFA3M16又はpLFA3M23により連結した。次ぎに欠乏の連結反応混合物を、MC1051中に形質転換し、欠乏のDNAを含むコロニーを、オリゴヌクレオチドプローブ(第11表参照)、HT16 cDNAの塩基対28-69に相補の20マーへLF28 P55中でハイブリッド形成することにより選択し、55℃で0.5xSSC(0.15M KCl、0.075M NaCl)にて洗浄した。正コロニーを拾い上げ、LB - sep 50μs/ml中で一晩増殖させ、かくしてDNAを調製した。挿入断片の正確な大きさは、制限酵素マッピングにより確認された。pLFA3M17の3つのクローン

正確な欠失を証明するために、DNAをEcoRIとHindIIIで消化し、3つのpLFA3M17コロニーが、正確な制限パターンを持つ一つのクローンの正確なDNA配列を、マクスマとギル、の方法(特許文献)を使用してDNA配列決定により確認

LF4-3M18

プラスミドpLFA3M18-2-40を、欠失を導入するオリゴヌクレオチドLF16(第11表)を適用した以外は、3M17に対して本質的に記載したようにして作成した。21ヌクレオチド塩基対652-653(第3図)に対して相補であり、かつ21ヌクレオチド塩基対716-731(第3図)に対して相補であるところの42mer(マー)である。ヌクレオチドLF16による変位誘発は、LFA-3の燐水基1遺伝領域に対してコード付けする18塩基対配列を除去細胞質の領域を低値のままにされた。発明者等は、pLFA3M18を分離し、かつ上記のようにその正確な証明した。

LF21-3M23

プラスミドpLFA3M23をpLFA3M17に対して記載法により構築した。変位誘発に対して使用したオリゴヌチドは、LF23(第11表)であって、その41マーは、21ヌチド塩基対641-651(第3図)に対して相補であり、20ヌクレオチド塩基対767-786(第3図)で相補であるところの61マーである。LF23による変位誘発誘発領域及びHT16-LFA-3の細胞受容体を除去し

安定なCHO細胞系を確立する為に、PstIで線状化されたpLFA3M17の10μsを、培養カルシウム浴と前記エポカレーションによりCHO細胞中に移入した。同じ方法でpLFA3M16とpLFA3M23で安定CHO細胞系を確立する為にした。

pLFA3M17で移入されたCHO細胞は、¹²⁵Sメチオ代謝標識化することにより可溶性LFA-3の分泌に対してされた。6ウェルプレートのウェル当たり5x10⁵細胞がメチオニンで18時間標識化され、かつ¹²⁵S-LFA-3を測定で沈殿させた。発明者等は、M17/CHOがLFA-3を分泌しを観察した。このことは、より高い発現を促る為に、M17/CHOはメトトレキサートの高い濃度中で増殖され、LFA-3遺伝子を増殖するのが良いことが理解されるべきである。

上記の発明を更に可能にする為に、発明者等の発明のLFA-3 DNA配列を担持する次のファージを、リンチカム、インビトロインターナショナル、カルチャーコレクションに1987年5月28日に預けた：

λ HT16[λ L110/LFA-3]

このファージは、本発明の発明のLFA-3 DNA配列を担持する。

猪表平2-501112

陸 軍 規 程 告

[illegible]

707/1388/01124

H. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE PUBLISHED		DATE RECEIVED	
COUNTRY OF ORIGIN		DATE RECEIVED	
V	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, issued Nov. 1980. (Washington, D.C.) "Molecular Cloning of the Human T-Lymphocyte Surface CD2/2L1 Antigen" see pp. 8710-8722, see particularly page 8715.	1-11	
X.D	Id. of Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 86, issued Oct. 1987. (Amsterdam, Netherlands) (Belvaux et al.). "Deficiency of Lymphocyte Proliferation Associated with Hemoglobinuria" see pages 1011-1025. see particularly page 1011-1012.	16-20	
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 79, issued Dec. 1982. (Washington, D.C.) (Sanchez-Madrid et al.). "Three distinct antigens associated with human T-lymphocytes mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, LFA-3" pages 7485-7493.	1-11	
X.E	Nature, Vol. 329, issued 29 Oct. 1987 (Tokyo, Japan), (388D). "An HLA-3 class II encoded a phospholipid linked membrane protein homologous to the receptor CD2" pages 843-844.	1-15	
A	Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 81, issued Jan. 1984. (Washington, D.C.) "Immunoactivation of Cell surface structures of cloned cytotoxic T lymphocytes by clone-specific antisera" pages 313-317.		
Y	J. of Immunology, Vol. 138, 1 June 1987. (Washington, D.C.) (Miklos et al.). "Human T cell receptor is mediated by LFA-3 on erythrocytes" pages 3507-3509.	18-20	

ATTACHMENT TO PCT/JEN/210
PAGE 55

Group 1: Clones 1-13 drawn to DNA sequences, vectors, host cells, polypeptide and a method of making the polypeptide.

NOTE: Steps 16-17 apply to a pharmaceutical com-
pensation and a method of increasing production.

Group III: Cited 19-20 drawn to a diagnostic composition
and a method of use.

the 1990s, the number of people in the world who are illiterate has increased from 1.2 billion to 1.5 billion. The number of illiterate people in the world is projected to reach 1.7 billion by the year 2015. The number of illiterate people in the world is projected to reach 1.7 billion by the year 2015.

第1頁の続き

⑤Int. Cl.	識別記号	庁内整理番号
C 12 N 1/21		7421-4B
C 12 P 5/10		
C 12 P 21/02	C	8214-4B
G 01 N 33/53	K	7906-2C
C 12 N 1/21		
C 12 R 1:10		
(C 12 R 21/02		
(C 12 R 1:10		
(C 12 P 21/02		
C 12 R 1:91		

②発明者	スプリンガー, テイモシー エイ	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02167、ニュートンノック ロード 28
②発明者	ヘツシヨン, キヤサリン	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02190、サウス ウス、6、フアンティン レーン 98
②発明者	テイザード, リチャード	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジャー デー 3、ハーバード ストリート 334
②発明者	マタリアノ, ロバート	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02158、ニュートン ト サイド パークウェイ 114
②発明者	ダステイン, マイケル エル	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02215、ボストン、メント 23、パーク ドライブ 231
④出願人	デイナーフアーバー キヤンサー インステイチュート インコーポレイテッド	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02115、ボストン、ストリート 44

④出願人	ウオルター, バーバラ ビー	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジャー ストリート 7
④出願人	スプリンガー, テイモシー エイ	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02167、ニュートンノック ロード 28
④出願人	ヘツシヨン, キヤサリン	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02190、サウス ウス、6、フアンティン レーン 98
④出願人	テイザード, リチャード	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジャー デー 3、ハーバード ストリート 334
④出願人	マタリアノ, ロバート	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02158、ニュートン ト サイド パークウェイ 114
④出願人	ダステイン, マイケル エル	アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02215、ボストン、メント 23、パーク ドライブ 231